

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 708 467

(21) N° d'enregistrement national :

93 09416

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 39/395, 9/08

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 30.07.93.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.02.95 Bulletin 95/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : PASTEUR MERIEUX SERUMS ET
VACCINS société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : Grandgeorge Michel, Gaston, Joseph,
Gattel Paule, Annic et Makula Marie-France,
Marguerite, Andrée.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Lemoine et Bemasconi.

(54) Préparations d'immunoglobulines stabilisées et procédé pour leur préparation.

(57) Préparations d'immunoglobulines humaines ou animales, en particulier polyclonales, qui comprennent, à titre de stabilisant de conservation sous forme liquide, un tensio-actif non ionique en concentration inférieure ou égale à 0,1 g/l et qui sont essentiellement dépourvues d'albumine.

FR 2 708 467 - A1



Préparations d'immunoglobulines stabilisées
et procédé pour leur préparation

La présente invention a trait à des préparations d'immunoglobulines (Ig) humaines ou animales, en particulier immunoglobulines polyclonales sanguines. La présente invention a également trait à un procédé de stabilisation des immunoglobulines.

5 Les immunoglobulines sont largement utilisées dans la prophylaxie et la thérapeutique. Leur mode d'administration par voie intraveineuse nécessite de réduire au maximum leur activité anticomplémentaire qui peut résulter d'une dénaturation des Ig conduisant notamment à la formation d'agrégats et de polymères.

10 Ainsi, la norme européenne publiée dans Pharmeuropa (3 (4), décembre 1991, 259-268) exige que les solutions d'immunoglobulines pour administration intraveineuse aient des taux d'agrégats et de polymères inférieurs ou égaux à 3 % des protéines totales et une activité anticomplémentaire inférieure ou égale à 1 unité CH 50 par mg d'Ig. La formation d'agrégats n'intervient pas seulement au cours de

15 la préparation des solutions d'immunoglobulines, mais aussi au cours de leur conservation sous forme liquide, notamment lors de leurs manipulations. En effet, les immunoglobulines ont tendance à se dénaturer aux interfaces liquide/gaz et liquide/solide, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité anticomplémentaire par formation d'agrégats solubles ou insolubles.

20 La demande de brevet français FR-A-2 301 266 propose un procédé de préparation de gamma-globulines injectables par voie intraveineuse. La mise sous forme pharmaceutique comprend la dissolution des gamma-globulines dans une solution aqueuse tamponnée et contenant du glycocolle et de l'albumine.

En outre, pour empêcher ou réduire toute dénaturation de surface (aux interfaces liquide/air ou liquide/solide), cette demande propose d'ajouter à la préparation pharmaceutique obtenue un agent tensio-actif non ionique. A titre d'agent tensio-actif, cette demande propose les Tweens ou le Pluronic 68. Dans le 5 seul mode de réalisation décrit, cette demande préconise l'utilisation de Tween 80 à une concentration de 0,1 % c'est-à-dire de 1 g/l. En conséquence, la mise sous forme pharmaceutique des gamma-globulines passerait par l'utilisation combinée de glycocolle, d'albumine et de tensio-actif non-ionique à une concentration de l'ordre de 1 g/l.

10 La demande de brevet européen EP-A 448 075 décrit un procédé de préparation d'Ig intraveineuses avec filtration sur membrane; dans lequel on cherche à empêcher la dénaturation des Ig lors de la filtration à l'aide d'un stabilisant tensio-actif, qui peut être un tensio-actif non ionique tel que le Pluronic. Le taux de stabilisant recommandé est compris entre 0,5 et 50 g/l. Il en résulte que le produit 15 final contient le tensio-actif à un taux très élevé.

H. L. Levine et al. (J. of Parenteral Science and Technology, volume 45 (3) mai-juin 1991, pages 160 à 165) rapportent une étude sur les effets protecteurs des tensio-actifs non ioniques contre la dénaturation de surface de solutions d'anticorps monoclonaux faiblement concentrées dans un test d'agitation. Les auteurs rapportent 20 une concentration efficace de l'ordre de 0,1 %, c'est-à-dire correspondant à 1 g/l. Aucune protection n'est par contre obtenue avec une concentration de 0,1 g/l.

Or il est établi qu'à ces concentrations élevées, ces agents tensio-actifs présentent des inconvénients sérieux en cas d'injection intraveineuse.

Ainsi, le brevet US-A-4 439 421 recommande de ne pas utiliser les tensio-actifs non ioniques tels que décrits notamment dans le brevet US-A-4 093 606 correspondant à la demande de brevet français ci-dessus, pour un problème d'innocuité vis-à-vis des cellules sanguines. Cela confirme les observations de J.C. KRANTZ et al. (J. Pharmacol Exp. Ther. 93, pages 188 à 195, 1948) sur le pouvoir hémolytique du Tween 20 à la concentration de 1 g/l. Le brevet US précité propose 25 de stabiliser les solutions d'Ig en vue de leur lyophilisation en combinant plusieurs types de stabilisants, macromolécules, protéines et polyols de bas poids moléculaire. Le polyéthylène glycol est préféré en liaison avec de l'albumine humaine et du glucose.

Il est en effet connu que l'albumine agit comme un stabilisant efficace pour les immunoglobulines.

Mais dans le contexte médical actuel, on cherche à éviter autant que faire se peut l'utilisation de substances d'origine humaine ou animale, qui présentent un 5 risque de contamination virale.

La demanderesse a maintenant découvert de façon surprenante qu'il était possible de préparer des solutions d'immunoglobulines stabilisées sous forme liquide à l'aide d'un tensio-actif non ionique en très faible concentration, tout en se passant des stabilisants habituels tels que l'albumine.

10 La présente invention a donc pour objet des préparations d'immunoglobulines humaines ou animales, en particulier polyclonales, et notamment IgG polyclonales, qui comprennent, à titre de stabilisant de conservation sous forme liquide, un tensio-actif non ionique en concentration inférieure ou égale à 0,1 g/l et qui sont essentiellement dépourvues d'albumine. Par essentiellement dépourvues d'albumine, il faut comprendre qu'aucune trace d'albumine n'est 15 détectée par la méthode de référence Pharmeuropa en électrophorèse sur acétate de cellulose, ce qui correspond à une quantité d'albumine inférieure à 1 % des IgG.

De préférence, la concentration en tensio-actif non ionique est comprise entre 0,02 et 0,05 g/l environ et est de préférence de l'ordre de 0,025 g/l.

20 De préférence, les préparations selon l'invention comprennent entre 30 et 120 g/l d'immunoglobulines.

Le tensio-actif non-ionique est choisi de préférence dans le groupe 25 consistant en monoooléate de sorbitanne polyoxyéthylène (20), éther octylphénylique du décaéthylène-glycol, monolaurate de sorbitanne polyoxyéthylène (20), copolymère mixte polyoxyéthylène/polyoxypropylène et polyoxyéthylène et Laurate de polyéthylène glycol 600.

Comme celi est d'usage, les préparations selon l'invention peuvent aussi comprendre un stabilisant de lyophilisation usuel tel que le saccharose, notamment 30 en concentration de l'ordre de 50 à 100 g/l.

Les préparations d'immunoglobulines selon l'invention ont également de préférence les caractéristiques préconisées par les normes en vigueur, tel que pH compris entre 4,0 et 7,4, osmolalité supérieure à 280 mosmol/kg par l'addition de solutés osmotiquement actifs, tels que des sels minéraux (tel que NaCl) ou des 35 sucres (tel que glucose, saccharose, maltose) ou des sucres-alcools (tels que mannitol, sorbitol) ou des acides aminés (tel que glycocolle).

Les préparations obtenues répondent aux critères de sécurité d'emploi particuliers aux solutions d'Ig pour administration intraveineuse, à savoir stérilité bactérienne et fongique, apyrogénicité, taux réduit d'agrégats et de polymères et activité anticomplémentaire réduite.

5 Les immunoglobulines présentes dans la préparation peuvent être obtenues à partir de plasma, de sérum ou de placenta par les méthodes classiques de fractionnement des protéines, complétées le cas échéant par des traitements spécifiques visant à réduire le taux d'agrégats et de polymères et/ou à réduire l'activité anticomplémentaire de la préparation (par exemple traitement modéré à la 10 pepsine ou à la plasmine, traitement dissociant à pH acide, modification chimique par réduction et /ou alkylation ou précipitation des agrégats et polymères par le 15 PEG).

Les préparations selon l'invention peuvent être des solutions prêtes à l'emploi, donc conservées sous forme liquide, ou être des solutions obtenues 20 extemporanément par dissolution d'un concentré lyophilisé.

La présente invention a également trait à un procédé de stabilisation des préparations d'immunoglobulines humaines ou animales, polyclonales, dans lequel on ajoute à la préparation un stabilisant de conservation sous forme liquide qui est un tensio-actif non ionique de façon à obtenir une concentration inférieure ou égale 25 à 0,1 g/l dans la préparation finale. De préférence, le tensio-actif non ionique est ajouté en concentration comprise entre 0,02 et 0,05 g/l environ et de préférence de l'ordre de 0,025 g/l. Le tensio-actif non ionique est choisi parmi ceux indiqués plus haut. L'agent tensio-actif est avantageusement ajouté juste avant le conditionnement final en flacons, mais il peut également être ajouté à un stade antérieur du procédé d'extraction et de purification des Ig.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'essais réalisés avec des préparations d'immunoglobulines selon l'invention.

On a simulé des conditions sévères de manipulation de flacons d'Ig intraveineuse à l'aide d'un test d'agitation. Des flacons de verre borosilicate de type I 30 de 50 ml sont remplis aseptiquement avec 20 ml d'une solution stérile d'Ig à 50 g/l. Les flacons sont agités à température ambiante de 20°C pendant 1 ou 2 h sur un agitateur de type oscillant/alternatif réglé pour 80 oscillations horizontales par minute.

L'activité anticomplémentaire (AcA) de la solution est mesurée selon le test décrit dans "Pharneuropa" (supra).

Essai 1 : effet protecteur du Tween 80

Composition de la solution d'Ig intraveineuse

Ig = 50 g/l

5

Saccharose = 100 g/l

NaCl = 1 g/l

pH = 4,3

Concentration variable de Tween 80 : de 0 à 100 mg/l

10

Tableau 1 :

	Tween 80 (mg/l)			
	0	10	25	100
*AcA avant agitation	0,34	0,35	0,35	0,36
*AcA après agitation 2 h	> 1,19	1,19	0,75	0,38

15

*CH 50 / mg Ig

Résultat : Une protection nette s'observe dès 25 mg/l. Elle est quasiment totale avec 100 mg/l de tensio-actif.

Essai 2 : effet protecteur du Triton X 100

Idem essai 1, mais avec du Triton X 100 au lieu du Tween 80 comme 20 tensio-actif

Tableau 2 :

	Triton X 100 (mg/l)			
	0	25	50	100
*AcA avant agitation	0,37	0,36	0,36	0,31
*AcA après agitation 2 h	0,50	0,34	0,36	0,19

25

*CH 50 / mg Ig

Résultat : Une protection totale est obtenue avec la plus faible concentration essayée, 25 mg/l.

Essai 3 : effet protecteur du Tween 80

Idem essai 1, mais avec une agitation de 1 h au lieu de 2 h.

Tableau 3 :

	5	*AcA avant agitation	Tween 80 (mg/l)	
			0	25
		*AcA après agitation 1 h	0,41	0,33
			0,70	0,27

*CH 50 / mg Ig

Résultat : Dans cet essai moins sévère, la concentration de 25 mg/l de Tween suffit à protéger totalement l'Ig.

Essai 4 : effet protecteur de l'albumine

10 Idem essai 1, mais utilisation d'albumine humaine au lieu de Tween 80 comme protecteur.

Tableau 4 :

	15	*AcA avant agitation	Albumine (mg/l)			
			0	100	1000	10.000
		*AcA après agitation 2 h.	0,34	0,36	0,26	0,29
			1,24	0,64	0,27	0,28

*CH 50 / mg Ig

Résultat : L'albumine exerce un effet protecteur sur l'Ig à partir d'une concentration comprise entre 100 et 1000 mg/l.

20 Tensio-actifs non ioniques préférés :

- Tween 80 (ester oléique du sorbitanne polyoxyéthylène fabriqué par Atlas).
- Triton X 100 (éther octyl-phénylique du polyoxyéthylène fabriqué par Rohm et Haas).
- Tween 20 (ester laurique du sorbitanne polyoxyéthylène)
- 25 - Pluronic F68 (copolymère de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène fabriqué par Ugine Kuhlmann).
- Laurate de polyéthylène glycol 600 (fabriqué par Gattefossé).

Le Tween 80 est préféré du fait de son absence de toxicité et de son emploi en formulation pharmaceutique ou alimentaire bien documenté (Voir l'ouvrage "Non

30. Ionic Surfactants" M. Schick éd. Marcel Dekker NY, 1967, 28, 923-970).

REVENDICATIONS

1. Préparations d'immunoglobulines humaines ou animales, en particulier polyclonales, qui comprennent, à titre de stabilisant de conservation sous forme liquide, un tensio-actif non ionique en concentration inférieure ou égale à 0,1 g/l et qui sont essentiellement dépourvues d'albumine.

5 2. Préparations selon la revendication 1, caractérisées en ce que la concentration en tensio-actif non-ionique est comprise entre 0,02 et 0,05 g/l environ, de préférence 0,025 g/l environ.

10 3. Préparations selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles comprennent entre 30 et 120 g/l d'immunoglobulines.

15 4. Préparations selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le tensio-actif non ionique est choisi dans le groupe consistant en monooléate de sorbitanne polyoxyéthylène (20), éther octylphénylique du décaéthylène-glycol, monolaurate de sorbitanne polyoxyéthylène (20), copolymère mixte polyoxyéthylène/polyoxypropylène et polyoxyéthylène et Laurate de polyéthylène glycol 600.

20 5. Préparations selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre un stabilisant de lyophilisation.

25 6. Procédé de stabilisation des préparations d'immunoglobulines polyclonales, dans lequel on ajoute à la préparation un stabilisant de conservation sous forme liquide qui est un tensio-actif non ionique de façon à 30 obtenir une concentration inférieure ou égale à 0,1 g/l dans la préparation finale.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 489050
FR 9309416

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes				
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 5, no. 41 (C-047) 18 Mars 1981 & JP-A-55 164 630 (GREEN CROSS CORP) 22 Décembre 1980 * abrégé * ---	1-6			
D, X	EP-A-0 448 075 (MITSUBISHI RAYON CO., LTD) * colonne 5, ligne 45 - colonne 6, ligne 16 * * colonne 8, ligne 33 - ligne 40 * ---	1-6			
D, X	JOURNAL OF PARENTERAL SCIENCE AND TECHNOLOGY vol. 45, no. 3, 1991, PHILADELPHIA, PA, USA pages 160 - 165 LEVINE ET AL 'THE USE OF SURFACE TENSION MEASUREMENTS IN THE DESIGN OF ANTIBODY-BASED PRODUCT FORMULATIONS' * le document en entier * ---	1-4, 6			
D, Y		5			
Y	WO-A-89 11297 (CENTOCOR, INC.) * revendications 1-21 * ---	5	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)		
Y	DE-A-32 08 523 (LABORATORIOS LANDERLAN, S.A.) * revendications 1-10 * ----	5	C07K		
A		1-4, 6			
2					
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur			
22 Mars 1994		Sitch, W			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire					
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant					